

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



6

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> C12N 15/53, 9/02, C12P 23/00		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> WO 00/61764 <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 19. Oktober 2000 (19.10.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP00/02711 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 28. März 2000 (28.03.00) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 199 16 140.2 9. April 1999 (09.04.99) DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> LINDEN, Hartmut [DE/DE]; St. Johanngasse 4, D-78462 Konstanz (DE). SANDMANN, Gerhard [DE/DE]; H. Steinhäuser Strasse 18, D-63065 Offenbach (DE). <b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
<b>(54) Title:</b> CAROTENE HYDROXYLASE AND METHOD FOR PRODUCING XANTHOPHYLL DERIVATIVES <b>(54) Bezeichnung:</b> CAROTINHYDROXYLASE UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON XANTHOPHYLLDERIVATEN <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to proteins with an enzymatic activity for converting <math>\beta</math>-carotene into zeaxanthin or canthaxanthin into astaxanthin, to nucleic acids that code for these proteins, to nucleic acid constructs containing these nucleic acids, to genetically modified organisms in which the genetic modification causes or increases the gene expression of this nucleic acid compared with a wild type, and to methods for producing xanthophyll derivatives.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft Proteine, die eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von <math>\beta</math>-Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin aufweisen, Nukleinsäuren, die diese Proteine codieren, Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend diese Nukleinsäuren, genetisch veränderte Organismen, wobei die genetische Veränderung die Genexpression dieser Nukleinsäure verglichen mit einem Wildtyp verursacht oder erhöht, sowie Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllderivaten.</p>			

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

## Carotinhydroxylase und Verfahren zur Herstellung von Xanthophyll-derivaten

### 5 Beschreibung

- Die vorliegende Erfindung betrifft Proteine, die eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin aufweisen, Nukleinsäuren die diese
- 10 Proteine codieren, Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend diese Nukleinsäuren, genetisch veränderte Organismen, wobei die genetische Veränderung die Genexpression dieser Nukleinsäure verglichen mit einem Wildtyp verursacht oder erhöht, sowie Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllderivaten.
- 15 Xanthophylle sind Sauerstoff-haltige Carotinoide tierischer, pflanzlicher oder mikrobieller Herkunft. Xanthophylle wie Lutein, Zeaxanthin oder Astaxanthin stellen als Pigmentierungsstoffe und Vorstufen von Vitamin A-Derivaten wichtige Zusatzstoffe in der
- 20 Human- und Tierernährung dar. Weiterhin weisen Xanthophylle eine gesundheitsfördernde Wirkung wie die Verstärkung der Immunantwort und, aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften, eine krebsvorbeugende Wirkung auf, was ihre Verwendung als Nutraceuticals interessant macht. Ein wirtschaftliches Verfahren zur Herstellung
- 25 von Xanthophyllen sowie Nahrungsmittel mit erhöhtem Xanthophyllgehalt sind daher von großer Bedeutung. Besonders wirtschaftliche Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllen sind biotechnologische Verfahren, die Proteine und Biosynthesegene der Xanthophyll-Biosynthese aus Xanthophyll-produzierenden Organismen
- 30 nutzen.

- Prokaryontische  $\beta$ -Carotin-Hydroxylasen, die die enzymatische Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin über  $\beta$ -Cryptoxanthin katalysieren, sowie die Gene die diese Proteine codieren sind
- 35 aus den Bakterien *Erwinia uredovora* (Misawa et al., J. of Bacteriology 1990, 6704-6712; EP 393690 B1), *Erwinia herbicola* (WO 9113078), *Agrobacterium aurantiacum* (Misawa et al., J. of Bacteriology 1995, 6575-6584; EP 735 137 A1), *Alcaligenes* sp. PC-1 (EP 735 137 A1), *Flavobacterium* sp. strain R1534 (Pasamontes
- 40 et al., Gene 1997, 185, 35-41; EP 747483 A2) sowie aus dem Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 (Masamoto et al., Plant Cell Physiol. 1998, 39(5), 560-564) bekannt.

- Ferner ist bekannt, daß die prokaryontischen  $\beta$ -Carotin-
- 45 Hydroxylasen aus *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* und *Erwinia uredovora* zusätzlich in der Lage sind, Canthaxanthin über Adonirubin in Astaxanthin umzuwandeln (Misawa et al., J.

of Bacteriology 1995, 6575-6584; Fraser et al., J. Biol. Chem. 1997, 272, 6128-6135).

- Aus eukaryontischen Quellen sind drei pflanzliche  $\beta$ -Carotin-
- 5 Hydroxylasen bekannt, die die enzymatische Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin über  $\beta$ -Cryptoxanthin katalysieren. Die entsprechenden cDNAs wurden aus *Arabidopsis thaliana* (Cunningham et al, J. Biol. Chem. 1996, 271, 24349-24352, WO 9736998), sowie aus *Capsicum annuum* L. (Bouvier et al., Biochimica et Biophysica
- 10 Acta 1998, 1391, 320-328) isoliert.
- Gene eukaryontischen Ursprungs haben gegenüber prokaryontischen Genen den Vorteil, daß sie in höheren transgenen Organismen wie Pflanzen besser exprimiert werden. Dennoch besteht für ein wirtschaftliches Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllderivaten
- 15 oder Nahrungsmitteln mit einem erhöhten Xanthophyllgehalt durch Einbau von eukaryontischen Nukleinsäuren in Organismen nach wie vor ein Bedarf zur Verbesserung und Steigerung der Xanthophyll-Produktivität.
- Darüber hinaus haben die entsprechenden eukaryontischen  $\beta$ -Carotin-
- 20 Hydroxylasen des Standes der Technik den Nachteil, daß sie nur eine geringe Substratbreite aufweisen, so daß sich Stoffwechselprodukte die von den Hydroxylasen nicht umgesetzt werden können, aufstauen und einen inhibierenden Effekt auf die Hydroxylasen ausüben können.
- 25 Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, den geschilderten Mängeln des Standes der Technik abzuhelpen und eine eukaryontische  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase mit verbesserten Eigenschaften zur Verfügung zu stellen.
- 30 Demgemäß wurde ein Protein gefunden, das eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin aufweist, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch
- 35 Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Homologie von mindestens 50 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO.2 aufweist.
- Im Folgenden werden unter Carotinhydroxylasen die erfindungs-
- 40 gemäßen Proteine verstanden, also Proteine die eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin aufweisen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete
- 45 Sequenz, die eine Homologie von mindestens 50 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO.2 aufweist.

Die in SEQ ID NO. 2 dargestellte Aminosäuresequenz beruht auf der Translation der in SEQ ID NO. 1 dargestellten cDNA Sequenz.

Die erfindungsgemäßen Proteine sind in der Lage, die Umwandlung  
5 eines  $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin,  $\beta$ -Carotin in  $\beta$ -Cryptoxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin in Zeaxanthin, Echinenon in 3'-Hydroxyechinenon, 3-Hydroxyechinenon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin),  $\alpha$ -Carotin in  $\alpha$ -Cryptoxanthin oder weiterer  
10 chemischer Verbindungen mit bis zu 40 C-Atomen, die einen  $\beta$ -Ionon-Ring enthalten in die entsprechenden 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Verbindungen oder die Umwandlung eines 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung von Canthaxanthin in Astaxanthin, Canthaxanthin  
15 in Phoenicoxanthin (Adonirubin), Phoenicoxanthin (Adonirubin) in Astaxanthin, Echinenon in 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin) oder weiterer chemischer Verbindungen mit bis zu 40 C-Atomen, die einen 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Ring enthalten in die entsprechenden 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Ver-  
20 bindungen, zu katalysieren.

Zur Veranschaulichung wird für die Xanthophylle, die sich vom  $\beta$ -Carotin ableiten auf das Biosyntheseschema in Misawa et al., J. Biotechnol. 1998, 59, Seite 174 (oben) verwiesen. Die  
25 Biosynthese von Lutein erfolgt ausgehend von  $\alpha$ -Carotin über  $\alpha$ -Cryptoxanthin.

Die Proteine, die eine von der Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz enthalten, die eine Homologie von mindestens  
30 50 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO.2 aufweist, weisen eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin auf, vorzugsweise in vergleichbarer Aktivität wie das Protein, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO. 2.

35 Unter Substitution ist der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die  
40 ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini  
45 des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

- 5 Unter Homologie zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Computerprogramms GAP (UWCGC, University of Wisconsin, Genetic Computer Group, Programmalgorithmus nach Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol. 1970, 48, 10 443-453) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight:	12
Length Weight:	4
Average Match:	2,912
15 Average Mismatch:	-2,003

- Unter einem Protein, das eine Homologie von mindestens 50 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO.2 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO.2 nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 50 %, vorzugsweise 60 %, besonders bevorzugt 70 % aufweist.

- 25 Mit den bekannten prokaryontischen  $\beta$ -Carotin-Hydroxylasen weist die erfindungsgemäße Carotinhydroxylase eine Homologie von 29,9 % (Flavobacterium), 36,8 % (Erwinia uredovora), 38,5 % (Erwinia herbicola), 35,0 % (Alcaligenes) und 35,6 % (Agrobacterium aurantiacum), mit der bekannten eukaryontischen  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase aus Arabidopsis thaliana eine Homologie von 41,2 % auf.

- Bevorzugt ist ein Protein, das eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin und eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von Canthaxanthin in Astaxanthin aufweist, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder ein von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Protein, das eine Homologie von mindestens 50 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO.2 aufweist.

- Diese bevorzugten Proteine sind in der Lage, die Umwandlung eines  $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin,  $\beta$ -Carotin in  $\beta$ -Cryptoxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin in Zeaxanthin, Echinenon in 3'-Hydroxyechinenon, 3-Hydroxyechinenon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin),  $\alpha$ -Carotin in  $\alpha$ -Cryptoxanthin

oder weiterer chemischer Verbindungen mit bis zu 40 C-Atomen, die einen  $\beta$ -Ionon-Ring enthalten in die entsprechenden 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Verbindungen und die Umwandlung eines 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung von Canthaxanthin in Astaxanthin, Canthaxanthin in Phoenicoxanthin (Adonirubin), Phoenicoxanthin (Adonirubin) in Astaxanthin, Echinenon in 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin) oder weiterer chemischer Verbindungen mit bis zu 40 C-Atomen, die einen 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Ring enthalten in die entsprechenden 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Verbindungen, zu katalysieren.

Ein besonders bevorzugtes Protein ist die eukaryontische Carotinhydroxylase aus der Grünalge *Haematococcus pluvialis* Flotow NIES-144 mit der Sequenz SEQ ID NO. 2. Dieses besonders bevorzugte Protein ist in der Lage, die Umwandlung eines  $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin,  $\beta$ -Carotin in  $\beta$ -Cryptoxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin in Zeaxanthin, Echinenon in 3'-Hydroxyechinenon, 3-Hydroxyechinenon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin),  $\alpha$ -Carotin in  $\alpha$ -Cryptoxanthin oder weiterer chemischer Verbindungen mit bis zu 40 C-Atomen, die einen  $\beta$ -Ionon-Ring enthalten in die entsprechenden 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Verbindungen und die Umwandlung eines 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung von Canthaxanthin in Astaxanthin, Canthaxanthin in Phoenicoxanthin (Adonirubin), Phoenicoxanthin (Adonirubin) in Astaxanthin, Echinenon in 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin) oder weiterer chemischer Verbindungen mit bis zu 40 C-Atomen, die einen 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Ring enthalten in die entsprechenden 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Verbindungen, zu katalysieren.

Die Carotinhydroxylasen lassen sich, wie nachstehend beschrieben durch Genexpression der entsprechenden Nukleinsäuren, die diese Proteine kodieren, aus natürlichen oder genetisch veränderten Organismen herstellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuren, im folgenden Carotinhydroxylase-Gene genannt, die die vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Proteine kodieren. Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich. Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismus spezifischen *codon usage* häufig verwendet werden. Die *codon usage* läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in einer Pflanze exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die *codon usage* der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

- 5 Eine bevorzugte Nukleinsäure hat die Sequenz SEQ ID NO. 1. Diese Nukleinsäure stellt eine eukaryontische cDNA aus der Grünalge *Haematococcus pluvialis* Flotow NIES-144 dar, die die Carotinhydroxylase der Sequenz SEQ ID NO. 2 codiert. Da das Leseraster der cDNA bis hin zum 5'-Ende offen ist, stellt die SEQ ID NO. 1
- 10 möglicherweise nicht die vollständige Sequenz der cDNA dar. Die Expression dieser cDNA führt zu einem funktionellen Protein. Eine eventuell fehlende Teilsequenz am 5'-Ende kann, in an sich bekannter Weise, durch Analyse von überlappenden cDNA-Fragmenten der cDNA-Bibliothek aus *Haematococcus pluvialis* Flotow NIES-144
- 15 ergänzt werden.

- Es ist bekannt, daß die Grünalge *Haematococcus pluvialis* unter ungünstigen Umweltbedingungen, wie bei einem Phosphat oder Stickstoffdefizit oder bei hoher Lichtintensität zum Schutz vor photo-
- 20 oxidativen Streß große Mengen Astaxanthin produziert (Kobayashi et al., Appl. Environ. Microbiol. 1993, 59, 867-873; Boussiba et al., Methods Enzymol 1992, 213, 386-391). Dieser Vorgang wird üblicherweise von einer morphologischen Veränderung begleitet, bei der sich die vegetativen Zellen der Grünalgen in Zyst-Zellen
- 25 entwickeln.

- Durch Zugabe von Natriumacetat und  $\text{FeSO}_4$  und Erhöhung der Lichtintensität wurde in einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* Flotow NIES-144 die Astaxanthinbiosynthese und die
- 30 Zyst-Zellbildung induziert. Aus diesem Stadium wurde zur Konstruktion einer cDNA-Bibliothek die RNA aus *Haematococcus pluvialis* isoliert. Die cDNA mit der Sequenz SEQ ID NO 1 wurde aus dieser cDNA-Bibliothek isoliert.

- 35 Alle vorstehend erwähnten Carotinhydroxylase-Gene sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen, wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden
- 40 kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungs-
- 45 verfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.



Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine der vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene, die mit einem oder mehreren Regulations-signalen zur Erhöhung der Genexpression verknüpft sind.

- 5 Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigent-
- 10 lichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Nukleinsäurekonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor
- 15 die vorstehend erwähnten Carotinhydroxylase-Gene inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Stattdessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können auch allein
- 20 vor die natürlichen Gene zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Nukleinsäurekonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nucleinsäuresequenz ermöglichen. Auch
- 25 am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die vorstehend erwähnten Carotinhydroxylase-Gene können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.
- 30 Vorteilhafte Regulationssequenzen für die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte, für das nachstehend beschriebene Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllen und für die nachstehend beschriebenen genetisch veränderten Organismen sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-
- 35 lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-,  $\lambda$ -P<sub>R</sub>- oder im  $\lambda$ -P<sub>L</sub>-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden.

- Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in
- 40 den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MF $\alpha$ , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], PRP1 [Ward et al., Plant.Mol. Biol.22(1993)], SSU, OCS, leb4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder
- 45 Phaseolin-Promotor enthalten.

Vorteilhaft sind insbesondere solche pflanzlichen Promotoren, die die spezifische Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Carotinoiden bzw. deren Vorstufen stattfindet oder in denen die Produkte vorteilhafterweise akkumuliert werden.

- Insbesondere zu nennen sind Promotoren für die ganze Pflanze aufgrund konstitutiver Expression, wie beispielsweise der CaMV Promotor, der OCS Promotor aus Agrobacterium (Octopin Synthase),  
10 der NOS Promotor aus Agrobacterium (Nopalinsynthase), der Ubiquitin Promotor, Promotoren vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines Prolin-reichen Proteins aus Weizen (WO 9113991),
- 15 samenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der Phaseolin Promotor und der USP Promotor aus Vicia faba, der Promotor des Legumin Gens aus Vicia (leb4) oder der Bce4-Gen Promotor aus Brassica (WO 9113980),
- 20 spezifische Promotoren für grüne Gewebe, wie beispielsweise der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase) oder der STLS1 Promotor (Solanum tuberosum, light harvesting system 1 aus Kartoffel),
- 25 mesophyllspezifische Promotoren, wie beispielsweise der FBPase Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO9705900),
- spezifische Promotoren für Knollen, Speicherwurzeln oder Wurzeln, wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel, der Promotor  
30 der Stärke Synthase (GBSS1) oder der Sporamin Promotor,
- fruchtspezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtspezifische Promotor aus Tomate (EP409625),
- 35 fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 9421794),
- blütenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO9216635) oder der Promotor des P-rr Gens  
40 (WO9822593),
- spezifische Plastiden- oder Chromoplasten-Promotoren, wie beispielsweise der RNA-Polymerase Promotor (WO9706250) oder
- 45 pathogen- oder chemisch induzierbare Promotoren, wie beispielsweise der PRP1-Promotor, ein durch Benzensulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al.,

(1992) Plant J. 2,397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP335528) oder ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO9321334) Promotor.

- 5 Auch der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus *Glycine max* (siehe auch Genbank Accession Nummer U87999) oder ein anderer Nodien-spezifischer Promotor wie in EP 249676 können vorteilhaft verwendet werden.
- 10 Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.
- 15 Im Nukleinsäurekonstrukt können noch weitere Gene, die in die Organismen eingebracht werden sollen, enthalten sein. Diese Gene können unter getrennter Regulation oder unter der gleichen Regulationsregion wie die vorstehend beschriebenen Carotinhydroxylase-Gene liegen. Bei diesen Genen handelt es sich beispielsweise um weitere Biosynthesegene der Carotinoidbiosynthese, die eine gesteigerte Synthese ermöglichen. Insbesondere seien weitere Gene der Carotinoidbiosynthese genannt, die biochemisch limitierend sind, wie die Gene codierend die Phytoensynthese, Phytoendesaturase, Isopentylpyrophosphat Isomerase oder die  $\beta$ -Cyclase.
- 25 Gene, codierend eine Isopentylpyrophosphat Isomerase sind beispielsweise aus den Organismen *Phaffia rhodozyma* und *Haematococcus pluvialis* (EP 769 551) oder *Arabidopsis thaliana* und *Tagetes* (Marigold) (WO 9736998) bekannt.
- 30 Gene, codierend eine Phytoensynthese sind beispielsweise aus den Organismen *Erwinia uredovora* (EP 393690), *Erwinia herbicola* (WO 9113078), Tomate (WO 9109128), Melone (WO 9602650), *Flavobacterium* (EP 747483) oder *Nicotiana* (US 5705624) bekannt.
- 35 Gene, codierend eine Phytoendesaturase sind beispielsweise aus den Organismen *Erwinia uredovora* (EP 393690), *Erwinia herbicola* (WO 9113078), *Nicotiana* (US 5539093) oder *Flavobacterium* (EP 747483) bekannt.
- 40 Gene, codierend eine  $\beta$ -Cyclase sind beispielsweise aus den Organismen *Erwinia uredovora* (EP 393690), *Erwinia herbicola* (WO 9113078), *Flavobacterium* (EP 747483), Tabak und Tomate (WO 9628014) oder *Capsicum annuum* (WO 9636717) bekannt.
- 45

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der nachstehend beschriebenen, genetisch veränderten Organismen wobei man die erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte in das Genom des Ausgangsorganismus einführt. Unter Ausgangsorganismen werden die Organismen vor der erfindungsgemäßen genetischen Veränderung verstanden.

Die erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte lassen sich prinzipiell über alle dem Fachmann bekannten Methoden in die nachstehend beschriebenen Ausgangsorganismen, die dadurch genetisch verändert werden, einführen.

Vorteilhaft werden sie über Transformation, Transfektion, Elektroporation, mit der sog. Partikelgun oder über Mikroinjektion in die Ausgangsorganismen bzw. deren Zellen eingebracht.

Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol.1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Guthrie et al. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, 1994, Academic Press entnehmen.

Als vorteilhaft seien beispielhaft Methoden wie das Einbringen der DNA über homologe oder heterologe Rekombination beispielsweise mit Hilfe des *ura-3*-Gens, speziell des *ura-3*-Gens von Ashbya, wie in der deutschen Anmeldung DE 19801120.2 beschrieben und/oder über die im folgenden beschriebene REMI-Methode (= "Restriktion-Enzyme-Mediated-Integration"), genannt.

Die REMI-Technik basiert auf der Kotransformation eines linearen DNA-Konstruktes, das an beiden Enden mit derselben Restriktionsendonuklease geschnitten wurde, zusammen mit der Restriktionsendonuklease, die für diese Restriktion des DNA-Konstrukts verwendet wurde, in einen Organismus. Die Restriktionsendonuklease schneidet daraufhin die genomische DNA des Organismus, in den das DNA-Konstrukt zusammen mit dem Restriktionsenzym eingebracht wurde. Dies führt zu einer Aktivierung der zelleigenen Reparaturmechanismen. Diese Reparaturmechanismen reparieren die durch die Endonuklease hervorgerufene Strangbrüche der genomischen DNA und bauen dabei mit einer gewissen Frequenz auch das kotransformierte

DNA-Konstrukt mit ins Genom ein. In der Regel bleiben dabei die Restriktionsschnittstellen an beiden Enden der DNA erhalten.

- Diese Technik wurde von Bölker et al. (Mol Gen Genet, 248, 1995: 547-552) für die Insertionsmutagenese von Pilzen beschrieben. Von Schiestl und Petes (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1991: 7585-7589) wurde die Methode zur Aufklärung, ob es bei *Saccharomyces* eine heterologe Rekombination gibt, verwendet. Zur stabilen Transformation und regulierten Expression eines induzierbaren Reportergens wurde die Methode von Brown et al. (Mol. Gen. Genet. 251, 1996: 75-80) beschrieben.

- Mit Hilfe der REMI-Methode können die erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragmente oder die vorstehend genannten, erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene an transcriptionsaktive Stellen im Genom plaziert werden.

- Vorteilhafterweise können die Nukleinsäuren zusammen mit mindestens einem Reportergen in ein DNA-Konstrukt kloniert werden, das in das Genom eingebracht wird. Dieses Reportergen sollte eine leichte Detektierbarkeit über einen Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo- oder Biolumineszenzassay oder über eine photometrische Messung ermöglichen. Beispielfhaft seien als Reportergene Antibiotikaresistenzgene, Hydrolasegene, Fluoreszenzprotein-gene, Biolumineszenzgene, Glucosidasegene, Peroxidasegen, das Luciferasegen,  $\beta$ -Galactosidasegen, gfp-Gen, Lipasegen, Esterasegen, Peroxidasegen,  $\beta$ -Lactamasegen, Acetyl-, Phospho- oder Adenyltransferasegen genannt. Diese Gene ermöglichen eine leichte Meßbarkeit und Quantifizierbarkeit der Transcriptionsaktivität und damit der Expression der Gene. Damit lassen sich Genomstellen identifizieren, die eine bis zu Faktor 2 unterschiedliche Produktivität zeigen.

- Sollen mehrere Gene, wie beispielsweise weitere crt-Gene der Carotinoidbiosynthese in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen mit einem Reportergen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen mit einem Reportergen in je einem Vektor in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können. Auch Genfragmente, die für die jeweiligen Aktivitäten kodieren können in der REMI-Technik eingesetzt werden.

- Für die Integration der erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene oder Nukleinsäurekonstrukte in das Genom von Ausgangsorganismen eignen sich prinzipiell alle bekannten Restriktionsenzyme. Restriktionsenzyme, die nur 4 Basenpaare als Restriktionsschnittstelle erkennen, sind weniger bevorzugt, da sie zu häufig im

## 12

- Genom oder im zu integrierenden Vektor schneiden, bevorzugt sind Enzyme die 6, 7, 8 oder mehr Basenpaare als Schnittstelle erkennen wie BamHI, EcoRI, BglII, SphI, SpeI, XbaI, XhoI, NcoI, SalI, ClaI, KpnI, HindIII, SacI, PstI, BpnI, NotI, SrfI oder SfiI
- 5 um nur einige der möglichen Enzyme zu nennen. Von Vorteil ist, wenn die verwendeten Enzyme keine Schnittstellen mehr in der einzuführenden DNA haben, dies erhöht die Effizienz der Integration. In der Regel werden 5 bis 500 U, bevorzugt 10 bis 250, besonders bevorzugt 10 bis 100 U der Enzyme im REMI-Ansatz verwendet. Die
- 10 Enzyme werden vorteilhaft in einer wässrigen Lösung eingesetzt, die Substanzen zur osmotischen Stabilisierung wie Zucker wie Saccharose, Trehalose oder Glucose, Polyole wie Glycerin oder Polyethylenglycol, eine Puffer mit einer vorteilhaften Pufferung im Bereich von pH 5 bis 9, bevorzugt 6 bis 8, besonders bevorzugt
- 15 7 bis 8 wie Tris, MOPS, HEPES, MES oder PIPES und/oder Substanzen zur Stabilisierung der Nukleinsäuren enthalten wie anorganische oder organische Salze von Mg, Cu, Co, Fe, Mn oder Mo. Es können gegebenenfalls noch weitere Stoffe enthalten sein wie EDTA, EDDA, DTT,  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Nukleasehemmstoffe. Es ist aber auch
- 20 möglich die REMI-Technik ohne diese Zusätze durchzuführen.

- Das Verfahren wird in einem Temperaturbereich von 5 bis 80°C, bevorzugt von 10 bis 60°C, besonders bevorzugt von 20 bis 40°C durchgeführt. Für das Verfahren eignen sich alle bekannten
- 25 Methoden zur Destabilisierung von Zellmembranen wie beispielsweise die Elektroporation, die Fusion mit beladenen Vesikeln oder die Destabilisierung über verschiedene Alkali- oder Erdalkalisalze wie Lithium, Rubidium- oder Calciumsalze bevorzugt sind die Lithiumsalze.

- 30 Die Nukleinsäuren können nach dem Isolieren direkt oder nach Aufreinigung für die erfindungsgemäße Reaktion verwendet werden.

- Das Einbringen der erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene oder
- 35 der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte in Pflanzen kann prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

- Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen
- 40 Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt.

- Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch
- 45 Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, die Verwendung einer Genkanone, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der

durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225, beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711). Die Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* wird beispielsweise von Höfgen und Willmitzer in Nucl. Acids Res. (1988) 16, 9877 beschrieben.

15 Mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Tagetes, Sonnenblume, Arabidopsis, Tabak, Roter Pfeffer, Soja, Tomate, Aubergine, Paprika, Möhre, Karotte, Kartoffel, Mais, Salate und Kohlarten, 20 Hafer, Roggen, Weizen, Triticale, Hirse, Reis, Luzerne, Flachs, Brassicaceen wie beispielsweise Raps oder Canola, Zuckerrübe, Zuckerrohr oder von Holzgewächsen wie beispielsweise Espe oder Eibe verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in 25 geeigneten Medien kultiviert werden.

Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und 30 R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten die Enzymaktivität der Carotinhydroxylase-Genprodukte in der Zelle zu erhöhen.

35 Eine Möglichkeit besteht darin, die endogenen Carotinhydroxylase-Gene zu verändern, daß sie für Enzyme mit gegenüber den Ausgangsenzymen erhöhter Carotinhydroxylase-Aktivität kodieren. Eine andere Erhöhung der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem durch Veränderung der katalytischen Zentren ein 40 erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzym-inhibitoren aufgehoben wird, das heißt sie weisen eine erhöhte spezifische Aktivität auf oder ihre Aktivität wird nicht gehemmt. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität in einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform durch Erhöhung der Enzymsynthese in der 45 Zelle erfolgen, beispielsweise durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzymsynthese reprimieren oder durch Erhöhung der Aktivität von Faktoren oder Regulatorelementen, die eine verstärkte

Synthese fördern, oder bevorzugt durch Einbringen weiterer Genkopien. Durch diese Maßnahmen wird die Gesamtaktivität der Genprodukte in der Zelle erhöht, ohne die spezifische Aktivität zu verändern. Es kann auch eine Kombination dieser Methoden verwendet werden, das heißt Erhöhung der spezifischen Aktivität sowie Erhöhung der Gesamtaktivität. Diese Änderungen können prinzipiell über alle dem Fachmann bekannten Methoden in die Nukleinsäuresequenzen der Gene, Regulationselemente oder deren Promotoren eingebracht werden. Hierzu können die Sequenzen beispielsweise einer Mutagenese wie einer "site directed mutagenesis" unterzogen werden wie sie in D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol.1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), Kapitel 6, Seite 193 ff beschrieben wird.

15 Von Spee et al. (Nucleic Acids Research, Vol. 21, No. 3, 1993: 777 - 778) wird eine PCR-Methode unter Verwendung von dITP zur zufälligen Mutagenese beschrieben.

Die Verwendung einer "in vitro" Rekombinationstechnik für die molekulare Evolution wird von Stemmer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, 1994: 10747 - 10751) beschrieben.

Von Moore et al. (Nature Biotechnology Vol. 14, 1996: 458 - 467) wird die Kombination der PCR- und Rekombinationsmethode beschrieben.

Die veränderten Nukleinsäuresequenzen werden anschließend wieder über Vektoren in die Organismen zurückgebracht.

30 Es können zur Erhöhung der Enzymaktivitäten auch veränderte Promotorbereiche vor die natürlichen Gene gebracht werden, so daß die Expression der Gene gesteigert wird und damit die Aktivität letztlich angehoben wird. Auch am 3'-Ende können Sequenzen eingebracht werden, die beispielsweise die Stabilität der mRNA erhöhen und dadurch eine erhöhte Translation ermöglichen. Dies führt ebenfalls zu einer höheren Enzymaktivität.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene oder Nukleinsäurekonstrukte zur Expression in einem der nachstehend beschriebenen Organismen in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, das eine optimale Expression der Gene in den prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen ermöglicht. Dieser Vektor kann zur Expression des erfindungsgemäßen Proteins das Startcodon ATG enthalten.

45



Geeignete Plasmide sind beispielsweise in E. coli pLG338, pA-CYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III<sup>113</sup>-B1,  $\lambda$ gt11, pBdCI, die pET Vektorserie (Novagen und Stratagene), pMAL oder die pQE Vektorserie (Quiagen), in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2  $\mu$ M, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLye23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHIac<sup>+</sup>, pBIN19, pAK2004, pDH51, oder Derivate der vorstehend genannten Plasmide.

- 10 Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden. Geeignete pflanzliche Vektoren werden unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben.

- 20 Vorteilhafterweise enthält das Nukleinsäurefragment zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3' und/oder 5' Terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtorganismus und Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.

- 25 Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

- 30 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

- 40 In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Wirtsorganismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurefragment als Vektor bestehen.

Als Vektor kann auch ein beliebiges Plasmid verwendet werden, das in der Zelle autonom repliziert, aber auch wie oben beschrieben ein lineares DNA-Fragment, das in das Genom des Wirtes integriert. Diese Integration kann über hetero- oder homologe Rekombination erfolgen. Bevorzugt wie erwähnt jedoch über homologe Rekombination (Steiner et al., Genetics, Vol. 140, 1995: 973-987). Dabei können die vorstehend erwähnten Carotinhydroxylase-Gene einzeln im Genom an verschiedenen Orten oder auf verschiedenen Vektoren vorliegen oder gemeinsam im Genom oder auf einem Vektor vorliegen.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen.

- 15 Ferner betrifft die Erfindung einen entsprechend genetisch veränderten Organismus, wobei die genetische Veränderung die Genexpression der erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene gegenüber einem Wildtyp
- 20 für den Fall, daß der Ausgangsorganismus ein erfindungsgemäßes Carotinhydroxylase-Gen enthält, erhöht oder für den Fall, daß der Ausgangsorganismus ein erfindungsgemäßes Carotinhydroxylase-Gen nicht enthält, verursacht.
- 25 Unter einem genetisch veränderten Organismus wird ein Organismus verstanden in dem die erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene oder Nukleinsäurekonstrukte, vorzugsweise nach einer der vorstehend beschriebenen Methoden insertiert wurden.
- 30 Der genetisch veränderte Organismus enthält mindestens ein erfindungsgemäßes Carotinhydroxylase-Gen oder mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt. Je nach Ausgangsorganismus kann die Nukleinsäure chromosomal oder extrachromosomal vorliegen.
- 35 Vorzugsweise weisen die genetisch veränderten Organismen verglichen mit dem Wildtyp einen veränderten Carotinoid-Stoffwechsel auf.
- 40 Als genetisch veränderte Organismen eignen sich prinzipiell alle Organismen, die in der Lage sind Xanthophylle zu synthetisieren.
- Bevorzugt sind Ausgangsorganismen, die natürlicherweise Xanthophylle synthetisieren können. Aber auch Ausgangsorganismen, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, sind geeignet.

Unter Ausgangsorganismen werden prokaryontische oder eukaryontische Organismen wie beispielsweise Mikroorganismen oder Pflanzen verstanden. Bevorzugte Mikroorganismen sind Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

5

Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organismus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Escherichia*, die beispielsweise crt-Gene aus *Erwinia* enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* oder Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*. Bevorzugte Bakterien sind *Escherichia coli*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. PC-1, *Flavobacterium* sp. strain R1534 oder das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803.

20 Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*.

Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Fusarium* oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus* *puvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Pflanzen als Ausgangsorganismen und dementsprechend auch als genetisch veränderte Organismen verwendet. Bevorzugte Pflanzen sind beispielsweise Tagetes, Sonnenblume, *Arabidopsis*, Tabak, Roter Pfeffer, Soja, Tomate, Aubergine, Paprika, Möhre, Karotte, Kartoffel, Mais, Salate und Kohlarten, Hafer, Roggen, Weizen, Triticale, Hirse, Reis, Luzerne, Flachs, Brassicaceen wie beispielsweise Raps oder Canola, Zuckerrübe, Zuckerrohr oder Holzgewächse wie beispielsweise Espe oder Eibe.

Besonders bevorzugt sind *Arabidopsis thaliana*, *Tagetes erecta*, Raps, Canola, Kartoffeln sowie Ölsaaten und typische Carotinoid-produzenten, wie Soja, Sonnenblume, Paprika, Karotte, Pfeffer oder Mais.

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllderivaten, dadurch gekennzeichnet, daß man ein  $\beta$ -Ionon-Strukturelement zu einem 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Strukturelement und/oder ein 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement zu einem 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement in Gegenwart des erfindungsgemäßen Proteins umsetzt.

Unter Xanthophyllderivaten werden Xanthophylle, vorzugsweise Xanthophylle die mindestens eine Hydroxygruppe enthalten, wie beispielsweise Zeaxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin, 3'-Hydroxyechinenon, 3-Hydroxyechinenon, Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin), Astaxanthin, Phoenicoxanthin (Adonirubin),  $\alpha$ -Cryptoxanthin oder Lutein oder davon abgeleitete Derivate mit bis zu 40 C-Atomen, die im Molekül zumindest ein 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon- oder zumindest ein 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement enthalten, wie beispielsweise 3-Hydroxy-6-Vinyl- $\beta$ -Ionon, 3-Hydroxy-4-Keto-6-Vinyl- $\beta$ -Ionon, 3-Hydroxy-retinol, 3-Hydroxy-4-Keto-retinol, 3-Hydroxy-retinal, 3-Hydroxy-4-Keto-retinal, 3-Hydroxy-retinsäure oder 3-Hydroxy-4-Keto-retinsäure verstanden.

Bevorzugte Xanthophyllderivate sind Zeaxanthin, Lutein und Astaxanthin.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird in Gegenwart der erfindungsgemäßen Proteine ein  $\beta$ -Ionon-Strukturelement in ein 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin,  $\beta$ -Carotin in  $\beta$ -Cryptoxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin in Zeaxanthin, Echinenon in 3'-Hydroxyechinenon, 3-Hydroxyechinenon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin),  $\alpha$ -Carotin in  $\alpha$ -Cryptoxanthin oder eine chemische Verbindung mit bis zu 40 C-Atomen, die einen  $\beta$ -Ionon-Ring enthält in die entsprechende 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Verbindung oder ein 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie Canthaxanthin in Astaxanthin, Canthaxanthin in Phoenicoxanthin (Adonirubin), Phoenicoxanthin (Adonirubin) in Astaxanthin, Echinenon in 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin) oder eine chemische Verbindung mit bis zu 40 C-Atomen, die einen 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Ring enthält in die entsprechende 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Verbindung umgesetzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens kultiviert man einen erfindungsgemäßen, vorstehend erwähnten genetisch veränderten Organismus, erntet diesen Organismus und isoliert anschließend die Xanthophyllderivate aus dem Organismus.

## 19

- Die Kultivierung des erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Organismus erfolgt in an sich bekannter Weise wie die Kultivierung des entsprechenden Wildtyps, beispielsweise bei Mikroorganismen in einem geeigneten Medium, wie beispielsweise auf
- 5 Agar-Platten oder in Suspensionskultur oder bei Pflanzen in Erde oder entsprechend geeigneten Nährböden.
- Unter Ernten wird im Falle von Mikroorganismen das Isolieren der Mikroorganismen bei Pflanzen das Abschneiden der Pflanze oder gegebenenfalls bestimmter, die Xanthophyllderivate enthaltende
- 10 Pflanzenteile verstanden.
- Die Isolierung der Xanthophyllderivate erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Aufschluß der Organismuszellen, Extraktion der Xanthophyllderivate und anschließender Aufreinigung der Xanthophyllderivate durch chemische oder
- 15 physikalische Trennmethoden, wie Extraktion oder Chromatographie.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase oder der erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene zur Herstellung von Xanthophyllderivaten.

## 20

Die nachstehenden Beispiele verdeutlichen die Erfindung

Beispiel 1

- Einbau des Carotinhydroxylase-Gens in einen  $\beta$ -Carotin produzierenden E. Coli, Fermentation des transgenen Organismus und
- 25 Isolierung der Xanthophylle

Allgemeine Arbeitsvorschriften

30 Isolierung der Carotinoide

- Zur Isolierung der Carotinoide (Carotine und Xanthophylle) wurden die E. coli Zellen durch Zentrifugieren gesammelt und das erhaltene Zellmaterial 24 h gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten
- 35 Zellen wurden in Aceton resuspendiert und zweimal bei 55°C mit Aceton 15 min extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit einem Diethylether/Petrolether (S.p. 35-80°C)-Gemisch (1:9, v/v) in einem Scheidetrichter gewaschen und unter Stickstoff im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt.

## 40

HPLC Analyse

- Die Auftrennung der Extrakte erfolgte mit Hilfe einer Nucleosil 100-5 C18-Säule (Macherey-Nagel) bei einem Eluenten-Flow von
- 45 1,5 ml/min.

- Für die Auftrennung von  $\beta$ -Carotin und den hydroxylierten Xanthophyllen in Beispiel 1 wurde ein Acetonitril/Methanol/2-Propanol-Gemisch (85:10:5, v/v/v; flow ) als Eluent verwendet. Zur Auftrennung der Ketogruppen-tragenden Xanthophylle in
- 5 Beispiel 2 wurde ein Acetonitril/Methanol/H<sub>2</sub>O-Gemisch (50:44:6, v/v/v) 22 min als Eluent 1 und Methanol als Eluent 2 verwendet. Die Detektion erfolgte direkt unter Verwendung des Waters 994 diode array-Detektors. Als Vergleichsstandard für die HPLC-Analyse wurden  $\beta$ -Carotin, Astaxanthin and Zeaxanthin von den
- 10 Firmen Sigma oder Roth bezogen.

### 1.1 Herstellung des $\beta$ -Carotin produzierenden E. Coli

- Als Organismus wurden E. coli-Zellen strain JM101 verwendet.
- 15 Das Plasmid pACCAR16DcrtX enthält die bakteriellen Carotinoid-Biosynthese-Gene crtE, crtB, crtI und crtY aus Erwinia uredovora and führt zur Biosynthese von  $\beta$ -Carotin (N. Misawa et al., J. Bacteriol. 172 (1990) 6704-6712; Biochem. Biophys. Res. Commun. 209 (1995) 867-876)
- 20 Zur Herstellung dieses Plasmids wurde ein 6,0 kb Asp718 (KpnI)-EcoRI-Fragment des Carotinoid-Biosynthesegen-Clusters aus Erwinia uredovora (Plasmid pCAR16delB) in die EcoRI-Stelle des Plasmids pACY184 (R.E. Rose, Nucl. Acids Res. 16 (1988) 355) kloniert. Das Plasmid pCAR16delB enthält eine Rahmenver-
- 25 schiebungs-Mutation im ORF (open reading frame) der  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase (Misawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 209 (1995) 867-876). Daher kann das anfallende  $\beta$ -Carotin nicht zu Zeaxanthin hydroxyliert werden.
- Die Insertion des Plasmids pACCAR16DcrtX in E. coli und die
- 30 Herstellung und Isolierung von transformierten E. coli-Zellen erfolgte in an sich bekannter Weise, wie in Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989, beschrieben.
- 35
- ### 1.2 Konstruktion einer Haematococcus pluvialis $\lambda$ cDNA Expressionsbibliothek und Isolierung des Plasmids, das das Carotin-Hydroxylase-Gen enthält

- 40 Haematococcus pluvialis Flotow NIES-144 stammte vom National Institute for Environmental Studies (NIES), Tsukuba, Japan. Das Basal-Medium (pH 6,8) in der Wachstumsphase von Haematococcus pluvialis enthielt pro Liter 1,2 g Natriumacetat, 2,0 g Hefe-Extrakt, 0,4 g L-Asparagin, 0,2 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,01 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,
- 45 und 0,02 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O. Haematococcus pluvialis wurde 4 Tage lang bei 20 °C in einem Dunkel/Licht-Zyklus von 12 h Licht (20  $\mu$ E/m<sup>2</sup>s) und 12 h Dunkelheit vermehrt.

Zur Induktion der Astaxanthin Biosynthese und zur Zyst-Zellbildung, wurden nach 4 Tagen Natriumacetat und  $\text{FeSO}_4$  bis zu einer Konzentration von 45 mM bzw. 450  $\mu\text{M}$  zugegeben. Nach der Zugabe wurden, wie in Kajiwara et al., Plant Mol. Biol. 29 (1995)

- 5 343-352 beschrieben, die Lichtverhältnisse auf kontinuierliches Licht (125  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ) umgestellt.
- Nach 8 h Induktion der Zyst-Zellen-Bildung wurden die RNAs von *Haematococcus pluvialis* zur Konstruktion einer cDNA Bibliothek, aus den Zyst-Zellen isoliert.
- 10 Die Reinigung der poly(A)RNA wurde unter Verwendung von Oligo (dT)-Cellulose (Biolabs) durchgeführt. Die Synthese der cDNAs und die Konstruktion der  $\lambda$ ZAP-Expressions-Bibliothek erfolgte mit Hilfe des *cDNA Synthesis and ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kits* (Stratagene). Die Erststrang cDNA-Synthese wurde unter
- 15 Verwendung der MMLV-Reverse Transkriptase und einem Poly (dT) Primer, der eine XhoI-Restriktionsenzym Erkennungsstelle enthält entsprechend der Stratagene Gebrauchsanweisung durchgeführt. Dementsprechend wurde die Synthese des zweiten Strangs unter Verwendung der DNA Polymerase I durchgeführt. Durch Auffüllen mit
- 20 Pfu-DNA-Polymerase wurden glatte DNA-Enden erzeugt an die EcoRI Adaptoren ligiert wurden. Die erhaltenen cDNA-Fragmente wurden anschließend nach der Größe fraktioniert und anschließend in die EcoRI - XhoI-Erkennungsstelle des Uni-ZAP XR Vektors ligiert. Nach Isolierung und Reinigung des positiven Carotinhydroxylase-
- 25 Plaques wurde das pBluescript Phagemid, das die Carotinhydroxylase-cDNA enthält, durch in-vivo-herausschneiden unter Verwendung des ExAssist Hilfsphagen und dem SOLR E. coli strain, entsprechend der Gebrauchsanleitung von Stratagene, zurück- erhalten. Das erhaltene Plasmid enthält zusätzlich zu den kurzen
- 30 Adapter-Sequenzen am 5'- (5'-AATTCGGCACGAG-3') und am 3'-Ende (5'-TCGAG-3') nach der DNA-Sequenz-Analyse ein 1608 bp langes cDNA-Fragment ligiert in die EcoRI und XhoI Restriktionsstelle der multiplen Klonierungsstelle. Dieses Plasmid wurde zur Insertion des Carotinhydroxylase-Gens in die, wie unter 1.1.
- 35 beschriebenen,  $\beta$ -Carotin-produzierenden E. coli-Zellen verwendet.

1.3. Einbau des Carotinhydroxylase-Gens in  $\beta$ -Carotin-produzierende E. coli-Zellen, Kultivieren der transformierten Zellen und Isolierung der Xanthophylle Zeaxanthin und  $\beta$ -Cryptoxanthin

- 40 Die Transformation der unter 1.1. beschriebenen,  $\beta$ -Carotin-produzierenden E. coli-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX mit dem unter 1.3 beschriebenen Plasmid, enthaltend das Carotinhydroxylase-Gens, erfolgte in an sich
- 45 bekannter Weise wie in J. Sambrook et al., Molecular cloning:

a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989, beschrieben.

Die transformierten *E. coli*-Zellen wurden 48 h in LB Medium bei 28°C unter Zugabe von Ampicillin (50 µg/ml; für das Plasmid enthaltend das Carotinhydroxylasegen) und Chloramphenicol (30 µg/ml; Plasmid pACCAR16DcrtX) gezüchtet.

Die Isolierung der Carotinoide erfolgte wie unter den allgemeinen Arbeitsvorschriften beschrieben. Fig. 1 zeigt die HPLC-Diagramme der Carotinoide extrahiert aus

(A) *E. coli*-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX nach 1.1

und

(B) *E. coli*-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX zusammen mit dem Carotinhydroxylase-Gen nach 1.2.

In Fig. 1 bedeuten die Peak-Nummern

3	Zeaxanthin
5	β-Cryptoxanthin
6	β-Carotin

Wie man Fig.1 entnehmen kann, produzieren die transformierten

*E. coli*-Zellen durch Einbau des erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gens die hydroxylierten Xanthophylle Zeaxanthin und β-Cryptoxanthin, während ohne die Transformation nur β-Carotin produziert wird. Die erfindungsgemäße Carotinhydroxylase ist dementsprechend in der Lage β-Carotin in β-Cryptoxanthin, β-Cryptoxanthin in Zeaxanthin oder β-Carotin in Zeaxanthin umzuwandeln.

### Beispiel 2

Einbau des Carotinhydroxylase-Gens und des β-Carotin-Ketolase-Gens (bkt) aus *Haematococcus pluvialis* in β-Carotin-produzierende *E. coli*-Zellen, Kultivieren der transformierten Zellen und Isolierung der Xanthophylle Astaxanthin, Canthaxanthin,

Adonixanthin, Zeaxanthin und β-Cryptoxanthin

2.1 Herstellung eines Plasmids enthaltend das β-Carotin-Ketolase-Gen (bkt) aus *Haematococcus pluvialis*

Zur Herstellung des Plasmids pRKbkt1 (Kajiwara et al., Plant Mol. Biol. 29 (1995) 343-352), enthaltend das β-Carotin-Ketolase-Gen aus *Haematococcus pluvialis* wurde ein 1 kb PvuII-partialverdautes



Produkt des Plasmids pUC19bkt durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Breitenbach et al., FEMS Microbiol. Lett. 140 (1996) 241-246.) Dieses DNA-Fragment enthält den lacZ-Promoter zusammen mit dem ORF (open reading frame) der Ketolase und wurde in das  
5 Plasmid pRK404, das zuvor mit HindIII verdaut und mit dem Klenow Enzym behandelt wurde, subkloniert.

Das erhaltene Plasmid pRKbkt1 wurde einmal alleine und einmal zusammen mit dem unter 1.2 beschriebenen Carotinhydroxylase-Gen-  
10 Plasmid in die  $\beta$ -Carotin-produzierenden E. coli-Zellen insertiert.

2.2 Einbau des Plasmid pRKbkt1 in  $\beta$ -Carotin-produzierende E. coli-Zellen, Kultivieren der transformierten Zellen und Isolierung des Xanthophylls Canthaxanthin

15 Die Transformation der unter 1.1. beschriebenen,  $\beta$ -Carotin-produzierenden E. coli-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX mit dem unter 2.1 beschriebenen Plasmid pRKbkt1, enthaltend das  $\beta$ -Carotin-Ketolase-Gen (bkt), erfolgte in an sich bekannter Weise  
20 wie in J. Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989, beschrieben.

Die transformierten E. coli-Zellen wurden analog wie unter 1.3  
25 beschrieben 48 h in LB Medium bei 28 °C, allerdings unter Zugabe von Chloramphenicol (30  $\mu$ g/ml; Plasmid pACCAR16DcrtX), Tetracyclin (10  $\mu$ g/ml; plasmid pRKbkt1) und Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (0.5 mM) gezüchtet.

30 Die Isolierung der Carotinoide erfolgte wie unter den allgemeinen Arbeitsvorschriften beschrieben.

Fig. 2 (A) zeigt das HPLC-Diagramm der Carotinoide, die aus E. coli-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX zusammen  
35 mit dem Plasmid pRKbkt1, enthaltend das  $\beta$ -Carotin-Ketolase-Gen (bkt) extrahiert wurden.

Durch Einbau des Plasmid pRKbkt1 produzieren die transformierten E. coli-Zellen das Ketogruppentragenden Xanthophyll Canthaxanthin.

40 2.3 Einbau des Plasmids pRKbkt1 und des Carotinhydroxylase-Gens in  $\beta$ -Carotin-produzierende E. coli-Zellen, Kultivieren der transformierten Zellen und Isolierung der Xanthophylle Astaxanthin, Canthaxanthin, Adonixanthin, Zeaxanthin und  $\beta$ -Cryptoxanthin

45

- Die Transformation der unter 1.1. beschriebenen,  $\beta$ -Carotin-produzierenden E. coli-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX mit dem unter 2.1 beschriebenen Plasmid pRKbkt1, enthaltend das  $\beta$ -Carotin-Ketolase-Gen (bkt) und mit dem unter 1.3 beschriebenen Plasmid, enthaltend das Carotinhydroxylase-Gen, erfolgte in an sich bekannter Weise wie in J. Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989, beschrieben.
- 10 Die transformierten E. coli-Zellen wurden analog wie unter 1.3 beschrieben 48 h in LB Medium bei 28°C, allerdings unter Zugabe von Ampicillin (50  $\mu$ g/ml; Plasmid enthaltend das Carotinhydroxylase-Gen), Chloramphenicol (30  $\mu$ g/ml; Plasmid pACCAR16DcrtX), Tetracyclin (10  $\mu$ g/ml; Plasmid pRKbkt1) und
- 15 Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactopyranosid (0,5 mM) gezüchtet.

Die Isolierung der Carotinoide erfolgte wie unter den allgemeinen Arbeitsvorschriften beschrieben. Fig. 2 zeigt die HPLC-Diagramme der Carotinoide extrahiert aus

20

(A) E. coli-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX nach 1.1 zusammen mit dem Plasmid pRKbkt1 und

(B) E. coli-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX zusammen mit dem Plasmid pRKbkt1 und dem Carotinhydroxylase-Gen nach 1.2.

25

Fig. 2 (C) zeigt Astaxanthin als Vergleichsstandard.

In Fig. 2 bedeuten die Peak-Nummern

30

- |      |                        |
|------|------------------------|
| 1    | Astaxanthin            |
| 2    | Adonixanthin           |
| 3    | Zeaxanthin             |
| 4    | Canthaxanthin          |
| 35 5 | $\beta$ -Cryptoxanthin |
| 6    | $\beta$ -Carotin       |

Wie man Fig. 2 entnehmen kann, produzieren die transformierten E. coli-Zellen durch Einbau des erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gens zusammen mit dem Plasmid pRKbkt1, enthaltend das  $\beta$ -Carotin-Ketolase-Gen (bkt) die hydroxylierten und/oder Ketogruppen-tragenden Xanthophylle Astaxanthin, Canthaxanthin, Adonixanthin, Zeaxanthin und  $\beta$ -Cryptoxanthin, während ohne dem erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gen nur Canthaxanthin

45 produziert wird.

In Enzymstudien an der  $\beta$ -Carotin-Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* konnte gezeigt werden, daß das Enzym hauptsächlich  $\beta$ -Carotin in Canthaxanthin umwandelt, während Hydroxylgruppen-tragende Xanthophylle, wie Zeaxanthin und  $\beta$ -Cryptoxanthin kaum  
5 und nur bis Adonixanthin und nicht bis Astaxanthin umgesetzt werden (T. Lotan, J. Hirschberg, FEBS Lett. 364 (1995) 125-128; J. Breitenbach, N. Misawa, S. Kajiwara, G. Sandmann, FEMS Microbiol. Lett. 140 (1996) 241-246; P.D. Fraser, H. Shimada, N. Misawa, Eur. J. Biochem. 252 (1998) 229-236).

10

Die Tatsache, daß die in Beispiel 2.3 transformierten *E. coli*-Zellen in der Lage sind Astaxanthin zu produzieren, beweist, daß die erfindungsgemäße Carotinhydroxylase in der Lage ist, Canthaxanthin über Phoenicoxanthin (Adonirubin) in Astaxanthin  
15 umzuwandeln.

Die erfindungsgemäße Carotinhydroxylase ist dementsprechend in der Lage, die Umwandlung eines  $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung  
20 von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin,  $\beta$ -Carotin in  $\beta$ -Cryptoxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin in Zeaxanthin, Echinenon in 3'-Hydroxyechinenon, 3-Hydroxyechinenon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin),  $\alpha$ -Carotin in  $\alpha$ -Cryptoxanthin oder weiterer chemischer Verbindungen mit bis zu 40 C-Atomen, die einen  $\beta$ -Ionon-Ring enthalten in die ent-  
25 sprechenden 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Verbindungen oder die Umwandlung eines 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung von Canthaxanthin in Astaxanthin, Canthaxanthin in Phoenicoxanthin (Adonirubin), Phoenicoxanthin (Adonirubin) in Astaxanthin, Echinenon in  
30 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin) oder weiterer chemischer Verbindungen mit bis zu 40 C-Atomen, die einen 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Ring enthalten in die entsprechenden 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Verbindungen, zu katalysieren.

35

40

45

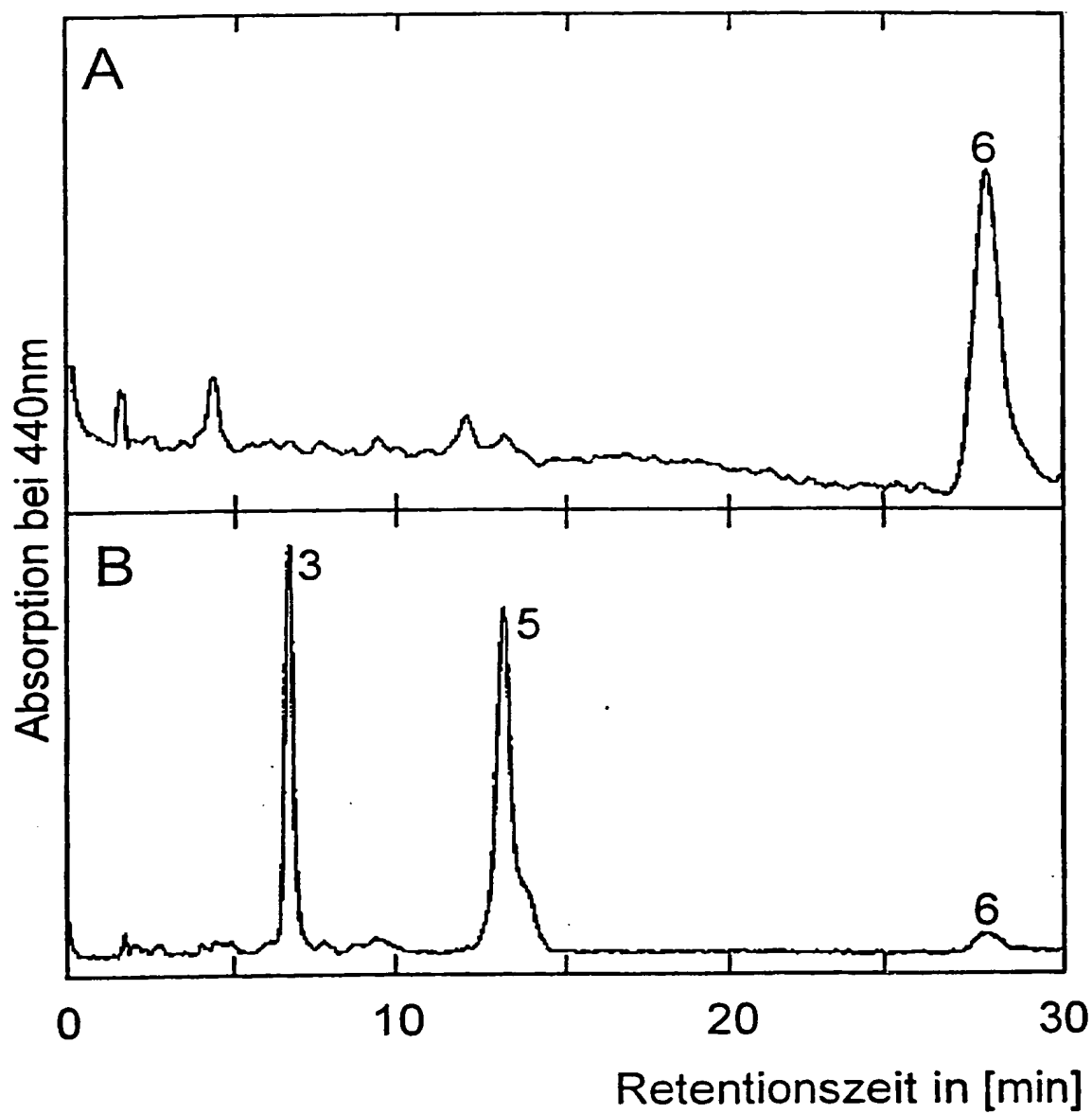
## Patentansprüche

1. Protein, das eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin aufweist, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Homologie von mindestens 50% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO.2 aufweist.
  2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin und eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von Canthaxanthin in Astaxanthin aufweist
  3. Nukleinsäure, codierend ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2.
  4. Nukleinsäure nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Sequenz besteht.
  5. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder 4, die mit einem oder mehreren Regulations-signalen zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft ist.
  6. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder 4 in einen Vektor insertiert, der für die Expression des Gens in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Organismus geeignet ist.
  7. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung die Genexpression einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder 4 gegenüber einem Wildtyp
- für den Fall, daß der Ausgangsorganismus eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder 4 enthält, erhöht oder
- für den Fall, daß der Ausgangsorganismus eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder 4 nicht enthält, verursacht.

Zeichn.

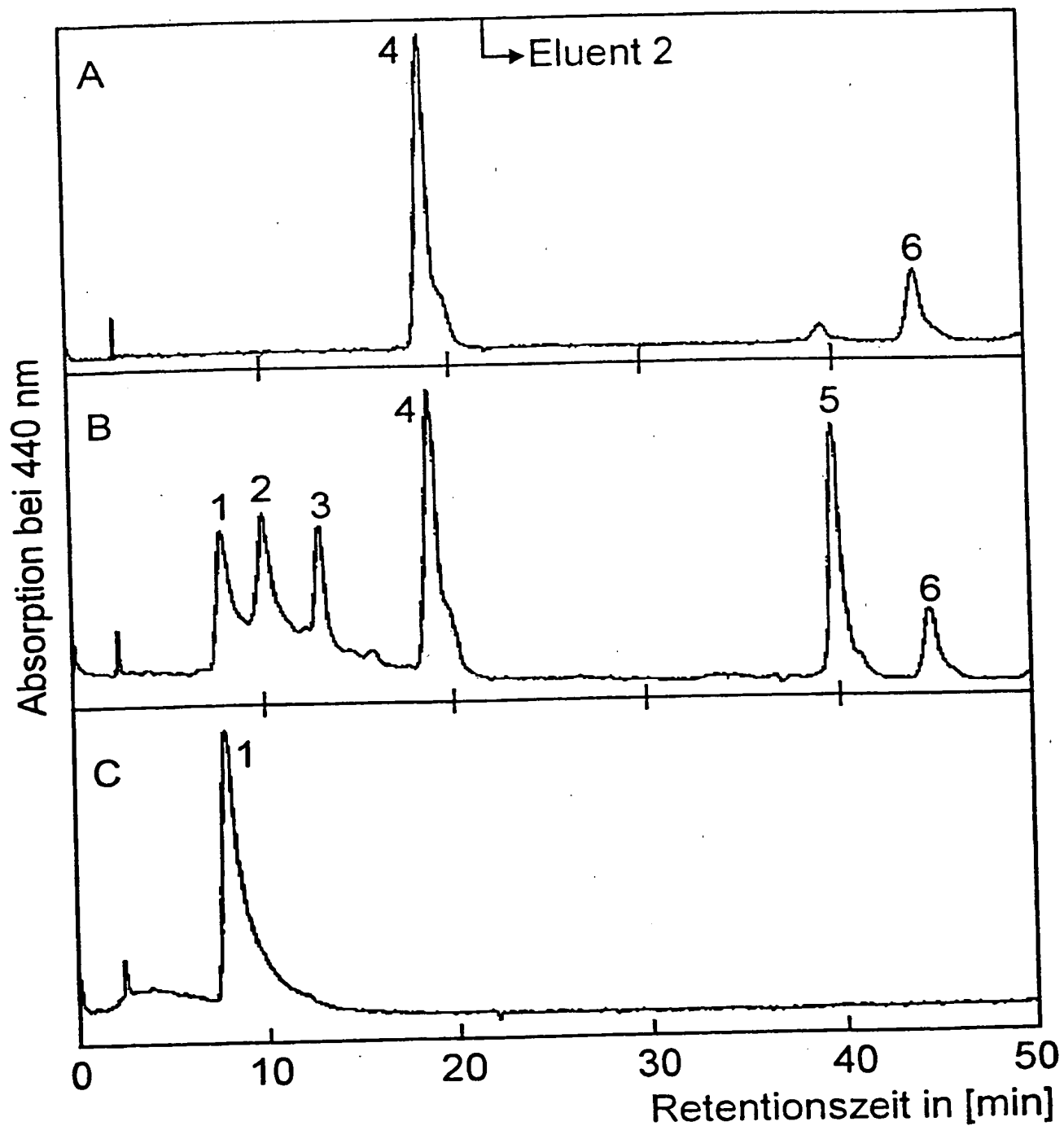
8. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der genetisch veränderte Organismus gegenüber dem Wildtyp einen veränderten Carotinoid-Stoffwechsel aufweist.
- 5
9. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus einen eukaryontischen Organismus verwendet.
- 10 10. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als eukaryontischen Organismus eine Pflanze verwendet.
11. Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen gemäß einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder 4 oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 5 oder 6 in das Genom des Ausgangsorganismus einführt.
- 15
- 20 12. Verwendung der Nukleinsäure nach Anspruch 3 oder 4 zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen.
13. Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllderivaten, dadurch gekennzeichnet, daß man ein  $\beta$ -Ionon-Strukturelement in ein 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Strukturelement und/oder ein 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement in ein 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement in Gegenwart eines Proteins gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 überführt.
- 25
- 30 14. Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllderivaten nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Organismus gemäß einem der Ansprüche 7 bis 10 kultiviert, den Organismus erntet und die Xanthophyllderivate anschließend aus dem Organismus isoliert.
- 35
15. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung von Xanthophyllderivaten.
16. Verwendung der Nukleinsäure nach Anspruch 3 oder 4 zur Herstellung von Xanthophyllderivaten.
- 40

FIG.1



2/2

FIG.2



## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF Aktiengesellschaft

<120> Carotinhydroxylase und Verfahren zur Herstellung von  
Xantophyllderivaten

&lt;130&gt; OZ 0050/49896

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Vers. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1607

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (3)..(968)

&lt;400&gt; 1

ct	aca	ttt	cac	aag	ccc	gtg	agc	ggt	gca	agc	gct	ctg	ccc	cac	atc	47
	Thr	Phe	His	Lys	Pro	Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	Leu	Pro	His	Ile	
	1				5				10				15			

ggc	cca	cct	cct	cat	ctc	cat	cgg	tca	ttt	gct	gct	acc	acg	atg	ctg	95
Gly	Pro	Pro	Pro	His	Leu	His	Arg	Ser	Phe	Ala	Ala	Thr	Thr	Met	Leu	
				20				25					30			

tcg	aag	ctg	cag	tca	atc	agc	gtc	aag	gcc	cgc	cgc	gtt	gaa	cta	gcc	143
Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Ser	Val	Lys	Ala	Arg	Arg	Val	Glu	Leu	Ala	
		35					40					45				

cgc	gac	atc	acg	cgg	ccc	aaa	gtc	tgc	ctg	cat	gct	cag	cgg	tgc	tcg	191
Arg	Asp	Ile	Thr	Arg	Pro	Lys	Val	Cys	Leu	His	Ala	Gln	Arg	Cys	Ser	
		50					55				60					

tta	gtt	cgg	ctg	cga	gtg	gca	gca	cca	cag	aca	gag	gag	gcg	ctg	gga	239
Leu	Val	Arg	Leu	Arg	Val	Ala	Ala	Pro	Gln	Thr	Glu	Glu	Ala	Leu	Gly	
	65				70					75						

acc	gtg	cag	gct	gcc	ggc	gcg	ggc	gat	gag	cac	agc	gcc	gat	gta	gca	287
Thr	Val	Gln	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Asp	Glu	His	Ser	Ala	Asp	Val	Ala	
	80				85				90						95	



2

ctc cag cag ctt gac cgg gct atc gca gag cgt cgt gcc cgg cgc aaa 335  
 Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys  
 100 105 110

cgg gag cag ctg tca tac cag gct gcc gcc att gca gca tca att ggc 383  
 Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly  
 115 120 125

gtg tca ggc att gcc atc ttc gcc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac 431  
 Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His  
 130 135 140

atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc 479  
 Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu  
 145 150 155

ctc ttg gtg gtt ggt ggc gcg ctc ggc atg gag atg tat gcc cgc tat 527  
 Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr  
 160 165 170 175

gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tcg cct ctg ggc tgg ctg ctg cac 575  
 Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His  
 180 185 190

aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg 623  
 Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu  
 195 200 205

ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc 671  
 Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly  
 210 215 220

ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg 719  
 Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu  
 225 230 235

ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg 767  
 Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu  
 240 245 250 255

gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg 815  
 Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met  
 260 265 270

aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt 863  
 Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly  
 275 280 285

ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att 911  
 Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile  
 290 295 300

cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg 959  
 Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp  
 305 310 315

tcc aag cgg taggggtgcgg aaccaggcac gctgggtttca cacctcatgc 1008  
 Ser Lys Arg  
 320

ctgtgataag gtgtggctag agcgatgcgt gtgagacggg tatgtcacgg tcgactggtc 1068

tgatggccaa tggcatcggc catgtctggt catcacgggc tggttgcctg ggtgaagggtg 1128

atgcacatca tcatgtgcgg ttggagggggc tggcacagtg tgggctgaac tggagcagtt 1188

gtccaggctg gcgttgaatc agtgagggtt tgtgattggc gggtgtgaag caatgactcc 1248

gccccatattc tatttgtggg agctgagatg atggcatgct tgggatgtgc atggatcatg 1308

gtagtgcagc aaactatatt cacctagggc tgttggtagg atcagggtgag gccttgcaca 1368

ttgcatgatg tactcgtcat ggtgtgttgg tgagaggatg gatgtggatg gatgtgtatt 1428

ctcagacgta gaccttgact ggaggcttga tcgagagagt gggccgtatt ctttgagagg 1488

ggaggctcgt gccagaaatg gtgagtggat gactgtgacg ctgtacattg caggcaggtg 1548

agatgcactg tctcgattgt aaaatacatt cagatgcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1608

<210> 2

<211> 322

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 2

Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly  
 1 5 10 15

Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser  
 20 25 30

Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg  
 35 40 45

Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu  
 50 55 60

Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr  
 65 70 75 80

Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu  
 85 90 95  
 Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg  
 100 105 110  
 Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val  
 115 120 125  
 Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met  
 130 135 140  
 Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala  
 165 170 175  
 His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys  
 180 185 190  
 Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe  
 195 200 205  
 Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe  
 210 215 220  
 Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val  
 245 250 255  
 His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys  
 260 265 270  
 Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly  
 275 280 285  
 Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro  
 290 295 300  
 Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser  
 305 310 315 320  
 Lys Arg

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 00/02711

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N15/53 C12N9/02 C12P23/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, STRAND

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 05, 31 May 1999 (1999-05-31) & JP 11 046770 A (KIRIN BREWERY CO LTD), 23 February 1999 (1999-02-23) abstract	1-16
A	FRASER P D ET AL: "In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1997 MAR 7) 272 (10) 6128-35., XP002142175 cited in the application the whole document	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*Δ\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 July 2000

Date of mailing of the international search report

26/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No  
PCT/EP 00/02711

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KRISHNA K B ET AL: "Secondary carotenoid production in green algae" JOURNAL OF SCIENTIFIC &amp; INDUSTRIAL RESEARCH, (FEB 1998) VOL. 57, NO. 2, PP. 51-63., XP000915400 the whole document</p>	1-16
A	<p>WO 99 07867 A (CALGENE LLC) 18 February 1999 (1999-02-18) claims</p>	1-16
A	<p>WO 97 36998 A (UNIV MARYLAND) 9 October 1997 (1997-10-09) cited in the application page 18; example I claims</p>	1-16
A	<p>BOUVIER FLORENCE ET AL: "Xanthophyll biosynthesis: Molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (Capsicum annuum L.)." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1391, no. 3, 22 April 1998 (1998-04-22), pages 320-328, XP000915250 ISSN: 0006-3002 cited in the application the whole document</p>	1-16
P,X	<p>LINDEN HARTMUT: "Carotenoid hydroxylase from Haematococcus pluvialis: cDNA sequence, regulation and functional complementation." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1446, no. 3, 3 September 1999 (1999-09-03), pages 203-212, XP000915274 ISSN: 0006-3002 the whole document</p>	1-16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int. Application No

PCT/EP 00/02711

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 11046770 A	23-02-1999	NONE	
WO 9907867 A	18-02-1999	AU 8900298 A EP 1002117 A	01-03-1999 24-05-2000
WO 9736998 A	09-10-1997	US 5744341 A AU 719727 B AU 1578497 A BR 9708375 A CA 2250096 A EP 0889952 A	28-04-1998 18-05-2000 22-10-1997 03-08-1999 09-10-1997 13-01-1999

# INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Int. l. nationales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/02711

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N15/53 C12N9/02 C12P23/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, STRAND

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 05, 31. Mai 1999 (1999-05-31) & JP 11 046770 A (KIRIN BREWERY CO LTD), 23. Februar 1999 (1999-02-23) Zusammenfassung	1-16
A	FRASER P D ET AL: "In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, (1997 MAR 7) 272 (10) 6128-35., XP002142175 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-16
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Δ" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Juli 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

26/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Andres, S

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>KRISHNA K B ET AL: "Secondary carotenoid production in green algae" JOURNAL OF SCIENTIFIC &amp; INDUSTRIAL RESEARCH, (FEB 1998) VOL. 57, NO. 2, PP. 51-63., XP000915400 das ganze Dokument</p>	1-16
A	<p>WO 99 07867 A (CALGENE LLC) 18. Februar 1999 (1999-02-18) Ansprüche</p>	1-16
A	<p>WO 97 36998 A (UNIV MARYLAND) 9. Oktober 1997 (1997-10-09) in der Anmeldung erwähnt Seite 18; Beispiel I Ansprüche</p>	1-16
A	<p>BOUVIER FLORENCE ET AL: "Xanthophyll biosynthesis: Molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (Capsicum annuum L.)." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1391, Nr. 3, 22. April 1998 (1998-04-22), Seiten 320-328, XP000915250 ISSN: 0006-3002 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	1-16
P,X	<p>LINDEN HARTMUT: "Carotenoid hydroxylase from Haematococcus pluvialis: cDNA sequence, regulation and functional complementation." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1446, Nr. 3, 3. September 1999 (1999-09-03), Seiten 203-212, XP000915274 ISSN: 0006-3002 das ganze Dokument</p>	1-16



# INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 00/02711

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 11046770 A	23-02-1999	KEINE	
WO 9907867 A	18-02-1999	AU 8900298 A EP 1002117 A	01-03-1999 24-05-2000
WO 9736998 A	09-10-1997	US 5744341 A AU 719727 B AU 1578497 A BR 9708375 A CA 2250096 A EP 0889952 A	28-04-1998 18-05-2000 22-10-1997 03-08-1999 09-10-1997 13-01-1999

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKewed/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**